

## 明 紹 書

## 中皮腫治療剤

## 技術分野

本発明は、新規な中皮腫治療剤及び中皮腫細胞抑制剤に関する。

## 背景技術

中皮腫は、胸部の肺あるいは心臓などの臓器や胃腸・肝臓などの腹部臓器をそれぞれ包む胸膜、腹膜、心膜の表面を覆う中皮に発生する腫瘍である。びまん性胸膜中皮腫では、胸壁胸膜側では肋間神経への浸潤によって胸痛をきたし、臓側胸膜側では腫瘍増生と胸水貯留により呼吸循環障害を生じることになる（高木、医学の歩み（別冊3月）「呼吸器疾患」 pp. 469-472, 1999）。やがて隣接する縦隔臓器に波及し心臓に直接浸潤したり横隔膜を介して腹腔側へ進展し、またリンパ行性あるいは血行性転移が加わり胸腔外進展していく（同上）。

アメリカでは年間3000人のびまん性胸膜中皮腫の発症が報告され、1980年代からの増加は著しく、60歳代の男性に多く女性の約5倍の頻度とされている（高木、医学の歩み（別冊3月）「呼吸器疾患」 pp. 469-472, 1999）。近年の欧米諸国の報告では中皮腫発生頻度は急速な増加傾向を示しており、1995年の英國疫学統計では今後25年間は中皮腫死亡が増え続けることを予想し、最悪の場合、1940年代生まれの男性の全死亡の1%が中皮腫によって占められる危険性を指摘している（中野、呼吸、18巻、9号、pp. 916-925, 1999）。

中皮腫については多くの異なった臨床病期分類が用いられており

、従来の中皮腫の治療報告は用いられる病期分類法が異なるため治療成績を比較する際の障害になっていた（中野、呼吸 18巻 9号 pp. 916-925, 1999）。そこで、1995年になって International Mesothelioma Interest Group (IMIG)により、悪性胸膜中皮腫に対する国際TNM分類が提案されている（中野、呼吸 18巻 9号 pp. 916-925, 1999）。

また、悪性中皮腫は石綿（アスベスト）暴露と因果関係があり、動物実験により証明もなされている（多田、医学のあゆみ（別冊3月）「呼吸器疾患」 pp. 406-408, 1999）。気道に吸入されたアスベストは胸膜直下に達し、少なくとも約20年の慢性刺激によって腫瘍が発生し、これが胸膜全面に浅く広がっていく（高木、医学の歩み（別冊3月）「呼吸器疾患」 pp. 469-472, 1999）。そのため、悪性中皮腫は石綿関連疾患に分類されるが、すべての悪性中皮腫が石綿によるものではなく、約半数の患者で明らかな暴露が認められている（多田、医学のあゆみ（別冊3月）「呼吸器疾患」 pp. 406-408, 1999）。

悪性胸膜中皮腫は治療に抵抗し予後は極めて不良であり早急に対策を講ずる必要がある（中野、呼吸、18巻、9号、pp. 916-925, 1999）。例えば、中皮腫に対する化学療法では、葉酸拮抗薬であるmethotrexate (MTX) はleucovin併用超大量単独療法の奏効率が37%と良好であったが、大量の胸水貯留をきたす中皮腫への実施は技術的に難しく、普及しなかった（中野、医学のあゆみ（別冊3月）「呼吸器疾患」 pp. 570-573, 2003）。また、びまん性胸膜中皮腫に対しては胸膜肺摘除術や胸膜切除術が行われているが、治療後再発をきたしやすく、ことに述後の局所再発率は35～43%と高い（高木、医学の歩み（別冊3月）「呼吸器疾患」 pp. 469-472, 1999）。

多くのヒト中皮腫細胞株およびいくつかのマウス中皮腫細胞株が

in vitroでIL-6を発現していることは知られており、IL-6を高発現しているマウス中皮腫細胞株AB22を移植したマウスでは、癌細胞増殖や臨床症状、末梢血リンパ球組織の変化に先立って血清でのIL-6検出が見られることが報告されている (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol Immunother 40: 241-250, 1995)。また、悪性胸膜中皮腫患者の血清中のIL-6レベルは、胸水流出 (pleural effusion) を伴う肺腺癌患者に比べて高く、悪性胸膜中皮腫の臨床症状の一つである血小板増加症に関して、血清中IL-6レベルと血小板の数に顕著な相関があることが知られている (Nakano, British Journal of Cancer 77(6): 907-912, 1998)。さらに腹膜中皮腫患者の腫瘍細胞はIL-6を高発現しており、死亡前には血清中のIL-6レベルが高くなることが報告されている (Higashihara, Cancer October 15, 1992, volume 70, No. 8, pp. 2105-2108)。

Bielefeldt-Ohmannらは、AB22を移植したマウスに週2回の割合でラット抗マウスIL-6抗体 (6B4) を投与したところ、臨床症状の開始および進行を顕著に弱める効果が認められたことを報告している (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol Immunother 40: 241-250, 1995)。しかしながら、Bielefeldtの報告によれば、抗IL-6抗体はin vitroでAB22に対して直接の増殖抑制効果は有さず、抗IL-6抗体で治療したマウスと治療しないマウスの死後の外観に違いはなく、治療したマウスにおいても相当に大きい腫瘍塊が認められた (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol Immunother 40: 241-250, 1995)。すなわち、抗IL-6抗体の中皮腫に対する増殖抑制はin vitroおよびin vivoのいずれにおいても知られていなかった。

高木, 医学の歩み (別冊3月) 「呼吸器疾患」 pp. 469-472, 1999

中野, 呼吸、18巻, 9号, pp. 916-925, 1999

多田, 医学のあゆみ (別冊3月) 「呼吸器疾患」 pp. 406-408, 19

99

中野, 医学のあゆみ(別冊3月) 「呼吸器疾患」 pp.570-573, 20  
03

Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol Immunother 40: 241-250,  
1995

Higashihara, Cancer October 15, 1992, volume 70, No. 8, pp.  
2105-2108

### 発明の開示

IL-6アンタゴニストが中皮腫そのものに作用して増殖抑制効果を示すことは知られていなかった。本発明は、IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する新規な中皮腫治療剤(中皮腫細胞の増殖抑制剤)を提供することを目的とする。

本発明者は、中皮腫細胞の増殖を抑制する新規な中皮腫治療剤を開発すべく、種々検討した結果、IL-6に関連するシグナル伝達を抑制又は遮断することにより、中皮腫細胞の増殖を抑制することが出来るという、新規な知見を得、本発明を完成させた。

従って、本発明は、インターロイキン-6(IL-6)アンタゴニストを有効成分として含んで成る中皮腫治療剤を提供する。

本発明はまた、インターロイキン-6(IL-6)アンタゴニストを有効成分として含んで成る中皮腫細胞に対する増殖抑制剤を提供する。

前記中皮腫は例えば胸膜中皮腫であり、より具体的には、例えば、悪性胸膜中皮腫である。悪性胸膜中皮腫にはびまん性胸膜中皮腫が含まれる。

前記IL-6アンタゴニストは、例えばIL-6に対する抗体又はIL-6受容体に対する抗体で、好ましくはIL-6受容体に対するモノクロー

ナル抗体である。前記IL-6受容体に対する抗体は、特に好ましくは、ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体、例えばPM-1抗体であり、あるいはマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体、例えばMR16-1抗体である。前記IL-6受容体に対する抗体は、好ましくは組換え型抗体である。

前記IL-6受容体に対する抗体は、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体であることが出来る。本発明において特に好ましい抗体は、ヒト型化PM-1抗体である。

本発明はまた、下記の形態をとることが出来る。

- (1) 中皮腫治療剤の製造のためのインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストの使用。
- (2) 前記中皮腫が胸膜中皮腫である、前記 (1) に記載の使用。
- (3) 前記胸膜中皮腫が、悪性胸膜中皮腫である、前記 (2) に記載の使用。
- (4) 前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の使用。
- (5) 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記 (4) に記載の使用。
- (6) 前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記 (4) に記載の使用。
- (7) 前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記 (4) に記載の使用。
- (8) 前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、前記 (4) ~ (7) のいずれかに記載の使用。
- (9) 前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、前記 (6) に記載の使用。
- (10) 前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR1

6-1抗体である、前記（7）に記載の使用。

（11）前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、前記（4）～（10）のいずれかに記載の使用。

（12）前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、前記（11）に記載の使用。

（13）中皮腫細胞に対する増殖抑制剤の製増のためのインターロイキン-6（IL-6）アンタゴニストの使用。

（14）前記中皮腫が胸膜中皮腫である、前記（13）に記載の使用。

（15）前記胸膜中皮腫が、悪性胸膜中皮腫である、前記（14）に記載の使用。

（16）前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、前記（13）～（15）のいずれかに記載の使用。

（17）前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記（16）に記載の使用。

（18）前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記（16）に記載の使用。

（19）前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、前記（16）に記載の使用。

（20）前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、前記（16）～（19）のいずれかに記載の使用。

（21）前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、前記（18）に記載の使用。

（22）前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR1-6-1抗体である、前記（19）に記載の使用。

（23）前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ

抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、前記（16）～（22）のいずれかに記載の使用。

（24）前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、前記（23）に記載の使用。

本発明はまた、下記の形態を探ることが出来る。

（1）中皮腫の治療方法において、当該治療を必要とする対象にインターロイキン-6（IL-6）アンタゴニストを投与することを含んで成る方法。

（2）前記中皮腫が胸膜中皮腫である、上記（1）に記載の方法。

（3）前記胸膜中皮腫が、悪性胸膜中皮腫である、上記（2）に記載の方法。

（4）前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、上記（1）～（3）のいずれかに記載の方法。

（5）前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、上記（4）に記載の方法。

（6）前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、上記（4）に記載の方法。

（7）前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、上記（4）に記載の方法。

（8）前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、上記（4）～（7）のいずれかに記載の方法。

（9）前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、上記（6）に記載の方法。

（10）前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、上記（7）に記載の方法。

（11）前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、上記（4）～（10）の

いずれかに記載の方法。

(12) 前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、上記(11)に記載の方法。

(13) 中皮腫細胞の増殖を抑制する方法において、当該抑制を必要とする対象にインターロイキン-6(IL-6)アンタゴニストを投与することを含んで成る方法。

(14) 前記中皮腫が胸膜中皮腫である、上記(13)に記載の方法。

(15) 前記胸膜中皮腫が、悪性胸膜中皮腫である、上記(14)に記載の方法。

(16) 前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、上記(13)～(15)のいずれかに記載の方法。

(17) 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、上記(16)に記載の方法。

(18) 前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、上記(16)に記載の方法。

(19) 前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、上記(16)に記載の方法。

(20) 前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、上記(16)～(19)のいずれかに記載の方法。

(21) 前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、上記(18)に記載の方法。

(22) 前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR1-1抗体である、上記(19)に記載の方法。

(23) 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、上記(16)～(22)のいずれかに記載の方法。

(24) 前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、上記（23）に記載の方法。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1の結果を示し、種々の悪性中皮腫細胞株のIL-6の生産性を示すグラフである。

図2は、実施例2の結果を示し、種々の悪性中皮腫細胞株のIL-6受容体(IL-6R)の生産性(生産しないこと)を示すグラフである。なお、GAPDHは、内在性コントロールとして使用したGAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)のmRNA量を示す。

図3は、実施例3の結果を示し、悪性中皮腫細胞株H2052及びH2452による血管形成誘導因子(VEGF)の産生が、IL-6とIL-6Rとにより誘導されることを示すグラフである。

図4は、実施例4の結果を示し、悪性中皮腫細胞株H28について、実施例3と同様な実験を行った結果であり、この細胞株はIL-6/IL-6Rによる誘導を必要としないで血管形成誘導因子(VEGF)を生産することを示すグラフである。

図5は、実施例5の結果を示し、IL-6によるVEGF産生誘導株であるH2025細胞株においては、IL-6による刺激によってSTAT3のリン酸化が促進されるのに対し、IL-6によるVEGF産生非誘導株であるH28細胞株においては、IL-6による刺激によってSTAT3のリン酸化が促進されないことを示すグラフである。

図6は、実施例6の結果を示し、IL-6によるVEGF産生誘導株であるH2025細胞株ではIL-6とIL-6Rとの刺激によりSOCS3の発現が誘導されるのに対し、IL-6によるVEGF産生非誘導株であるH28細胞株では、非誘導的にSOCS3が発現されることを示すグラフである。

図7は、実施例7で使用したプラスミドpGL3-VEGF及びpGL3-VEGF

mutのプロモーター及びその近傍の構造を示す図である。

図8は、実施例7に結果を示し、VEGFプロモーターをルシフェラーゼレポーター遺伝子に連結した系において、VEGFプロモーター中のp-STAT3結合部位を変異した場合IL-6によるVEGFプロモーターの活性化が生じないことを示すグラフである。

図9は、実施例5～7の結果から推定される、H2052細胞株における、IL-6による刺激によるVEGFプロモーターの誘導（VEGFの産生）のメカニズムを示す模式図である。

図10は、実施例8の結果を示し、H2052細胞株の増殖が、IL-6Rの存在下で、IL-6濃度依存的に増加することを示すグラフである。

図11は、実施例9の結果を示し、IL-6及びIL-6RによるH2052細胞株の増殖の促進が、MRAにより抑制されることを示すグラフである。

図12は、実施例10の結果を示し、H226細胞株の増殖が、IL-6Rの存在下でIL-6濃度依存的に増加すること、及びMRAの抑制効果を示すグラフである。

図13は、実施例8の結果を示し、H226細胞の増殖が、IL-6Rの存在下で、IL-6濃度依存的に増加することを示すグラフである。

図14は、実施例11の結果を示し、IL-6及び可溶性IL-6受容体による悪性中皮腫細胞株H2052細胞及びH226の増殖促進作用を、ヒト型化PM-1抗体が抑制することを示すグラフである。

図15は、実施例12の結果を示し、悪性中皮腫細胞株MSTO、H226、H2052及びH2452におけるIL-6の刺激によるVEGFの生産誘導が、ヒト型化PM-1抗体により抑制されることを示すグラフである。

図16は、実施例13の結果を示し、H2052株及びH2452細胞株において、IL-6及び可溶性IL-6受容体の刺激により誘導されるSTAT3のリン酸化がヒト型化PM-1抗体により抑制されることを示すグラフである。

る。

図17は、実施例14の結果を示し、IL-6及び可溶性IL-6受容体の刺激によるH2052細胞株及びH226細胞株の増殖促進が、抗VEGF抗体により抑制されないことを示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

IL-6はB細胞刺激因子2(BSF2)あるいはインターフェロン $\beta$ 2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、Bリンパ球系細胞の活性化に関する分化因子として発見され(Hirano, T. et al., *Nature* (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった(Akira, S. et al., *Adv. in Immunology* (1993) 54, 1-78)。IL-6は、Tリンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている(Lotz, M. et al., *J. Exp. Med.* (1988) 167, 1253-1258)。

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である(Tagai, T. et al., *J. Exp. Med.* (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. et al., *Science* (1987) 241, 825-828)。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130kDの膜蛋白質gp130である。IL-6とIL-6受容体はIL-6/IL-6受容体複合体を形成し、次いでgp130と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞内に伝達される(Tagai, T. et al., *Cell* (1989) 58, 573-581)。

IL-6アンタゴニストは、IL-6の生物学的活性の伝達を阻害する物

質である。これまでに、IL-6に対する抗体（抗IL-6抗体）、IL-6受容体に対する抗体（抗IL-6受容体抗体）、gp130に対する抗体（抗gp130抗体）、IL-6改変体、IL-6又はIL-6受容体部分ペプチド等が知られている。

抗IL-6受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある（Novick, D. et al., *Hybridoma* (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., *Hybridoma* (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号WO 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2694767、米国特許番号US 5 21628）。その一つであるマウス抗体PM-1 (Hirata, Y. et al., *J. Immunol.* (1989) 143, 2900-2906) の相捕性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている（国際特許出願公開番号WO 92-19759）。

前記IL-6アンタゴニストは、好ましくはIL-6受容体に対する抗体であり、好ましくはヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体又はマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である。上記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体としてはPM-1抗体が例示され、またマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体としてはMR 16-1抗体が挙げられる。前記の抗体は、好ましくは、キメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体であり、例えばヒト型化PM-1抗体である。

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、中皮腫細胞の増殖を抑制し、中皮腫治療剤の活性成分として有用なものであれば、その由来、種類および形状を問わない。

IL-6アンタゴニストは、IL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストは、好ましくはIL-6、IL-6受容体及びgp130のいずれかの結合に対する阻

害作用を有する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、例えば抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130抗体、IL-6改変体、可溶性IL-6受容体改変体あるいはIL-6又はIL-6受容体の部分ペプチドおよび、これらと同様の活性を示す低分子物質が挙げられる。

本発明で使用される抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに產生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に產生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) やSK2抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

抗IL-6抗体產生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体產生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550、J. Immunol. (1988) 140, 153 4-1541、あるいはAgr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688に開

示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に產生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1抗体 (Hi rata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体 (国際特許出願公開番号WO 92-19759)などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1 丁目1 番地1 中央第6) に、平成元年7月12日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、MR16-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、Rat-mouse hybridoma MR

16-1として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、平成9年3月13日に、FERM BP-5875としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

抗IL-6受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。IL-6受容体蛋白質は、本発明で用いられる抗IL-6受容体抗体の作製の感作抗原として使用されうる限り、いずれのIL-6受容体を使用してもよい。

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中

から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2Rを含有する大腸菌(E.coli)は、平成元年(1989年)1月9日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、HB101-pIBIBSF2Rとして、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明で使用される抗gp130抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに產生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に產生されるものがある。この抗体はgp130と結合することにより、IL-6/IL-6受容体複合体のgp130への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、AM64抗体(特開平3-219894)、4B11抗体および2H4抗体(US 5571513) B-S12抗体およびB-P8抗体(特開平8-291199)などが挙げられる。

抗gp130モノクローナル抗体產生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗

体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130は、欧州特許出願公開番号EP 411946に開示されたgp130遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

gp130の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のgp130蛋白質を公知の方法で精製し、この精製gp130受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130を発現している細胞やgp130蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.6 53 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550) 、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7) 、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519) 、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415) 、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270) 、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21) 、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) 、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C. 、Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG) 、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1~10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培

養液中でよく混合し、予め、37°C程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を通常、30～60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原蛋白質又は抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W0 93/12227、W0 92/03918、W0 94/02602、W0 94/25585、W0 96/34096、W0 96/33735 参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当

該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、平成元年7月12日に、FERM BP-2998としてブタペスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim 製) 含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM培地 (GIBCO-BRL 製)、PFHM-II 培地 (GIBCO-BRL 製) 等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)

等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Ch

imeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体、ヒト (human) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V 領域をコードするDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し產生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラPM-1抗体のL鎖およびH鎖のV 領域をコードするDNA を含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (グレートブリテン及び北部アイルランド連合王国 スコットランド アバディーン AB2 1RY マックハードライブ通り 23) に、1991年2月12日に、各々NCIMB 40366 及びNCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (FR; framework region) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み

込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる（欧洲特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号W0 92-19759参照）。

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体C領域としては、 $C\gamma$ が挙げられ、例えば、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$ 又は $C\gamma 4$ を使用することができる。また、抗体又はその產生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号W0 92-19759参照）。

また、ヒト抗体の取得方法としては先に述べた方法のほか、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することもできる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可

変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適當な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーヤヒトエロンゲーションファクター1  $\alpha$  (HEF1  $\alpha$ ) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114)、また、HEF1  $\alpha$  ロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のため

のシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Ward, E. S. et al., *Nature* (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al. *FASEB J.* (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Better, M. et al. *Science* (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al. *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに產生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の產生系を使用することができる。抗体製造のための產生系は、*in vitro* および *in vivo* の產生系がある。*in vitro* の產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる產生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば

、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を產生してもよい。

一方、*in vivo* の產生系としては、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系などがある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体

内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したパキュロウイルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のように *in vitro* 又は *in vivo* の產生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) 又は軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを单一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片とし

ては、Fab、F(ab')2、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適當なリンカーで連結させたシングルチェインFv(scFv)が挙げられる。

具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適當な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖又は、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖又は、L鎖V領域をコードするDNAを雛型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合せて増幅することにより得られる。

また、一旦 scFvをコードするDNA が作製されれば、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により產生させることができる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

前記のように產生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、P0 ROS、Sephadex G-25等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

これらのクロマトグラフィーはHPLC (High performance liquid chromatography) に適用し得る。また、逆相HPLC (reverse phase HPLC) を用いてもよい。

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1  $\mu$  g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAG製) 100  $\mu$  lを96穴プレート (Nunc製) に加え、4 °Cで一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL 製)100  $\mu$  lを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

洗浄後、5000倍希釈したアルカリリフォスマターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$  lを加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

本発明で使用されるIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログ

ラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、產生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。

IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648、WO 96-17869に開示されている。

本発明で使用されるIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10~80、好ましくは20~50、より好ましくは20~40個のアミノ酸残基からなる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる

方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、產生及び精製方法に準じて得ることができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。

具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明 廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 $\alpha$ -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの $\alpha$ -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応をする。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体からの切断をしペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA中で上記と同様の操作で脱保護

反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応を行うことができる。

得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マススペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

IL-6部分ペプチド及びIL-6受容体部分ペプチドの具体例は、特開平2-188600、特開平7-324097、特開平8-311098及び米国特許公報US 5210075に開示されている。

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストのIL-6シグナル伝達阻害活性は、通常用いられる方法により評価することができる。具体的には、IL-6依存性ヒト骨髄腫株 (S6B45, KPMM2)、ヒトレンネルトTリンパ腫細胞株KT3、あるいはIL-6依存性細胞MH60.BSF2を培養し、これにIL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを共存させることによりIL-6依存性細胞の<sup>3</sup>H-チミジン取込みを測定すればよい。

また、IL-6受容体発現細胞であるU266を培養し、<sup>125</sup>I 標識IL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを加えることにより、IL-6受容体発現細胞に結合した<sup>125</sup>I 標識IL-6を測定する。上記アッセイ系において、IL-6アンタゴニストを存在させる群に加えIL-6アンタゴニストを含まない陰性コントロール群をおき、両者で得られた結果を比較すればIL-6アンタゴニストのIL-6阻害活性を評価することができる。

後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体により、中皮腫細胞の増殖抑制効果が認められたことから、抗IL-6受容体抗体等

のIL-6アンタゴニストは中皮腫の治療剤として有用であることが示唆された。

本発明における治療対象は哺乳動物である。治療対象の哺乳動物は、好ましくはヒトである。

本発明の中皮腫治療剤又は中皮腫細胞増殖抑制剤は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、胸腔内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mgから100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000 mg、好ましくは5～50mgの投与量を選ぶことができる。

好ましい投与量、投与方法は、たとえば抗IL-6レセプター抗体の場合には、血中にフリーの抗体が存在する程度の量が有効投与量であり、具体的な例としては、体重1 kgあたり1ヶ月（4週間）に0.5 mgから40mg、好ましくは1 mgから20mgを1回から数回に分けて、例えば2回／週、1回／週、1回／2週、1回／4週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与する方法などである。投与スケジュールは、病状の観察および血液検査値の動向を観察しながら2回／週あるいは1回／週から1回／2週、1回／3週、1回／4週のように投与間隔を延ばしていくなど調整することも可能である。

本発明の中皮腫治療剤又は中皮腫細胞増殖抑制剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロー

スナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスタークナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HS A)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

### 実施例

以下、実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1. 悪性中皮腫細胞株によるIL-6の産生

培養液 (10% fetal calf serum(FCS) 添加RPMI) 中、24-ウェルプレート中で、細胞濃度 $5 \times 10^4$  / ウエルで、悪性中皮腫細胞株、MST0、H2052、H28、H226及びH2452の培養を開始し、翌日細胞培養液を交換し、その後更に3日間培養し、培養上清中のIL-6の濃度を、全自动化学発光酵素免疫測定システム (富士レビオ、ルミパルス) により測定し、細胞蛋白質の量で補正した。結果を図1に示す。実験は3連で行った。H28細胞系はIL-6無産生株であったが、他の4株はIL-6産生株であった。特にH2052細胞株及びH226細胞株はIL-6高産生株と考えられた。

#### 実施例 2. 悪性中皮腫細胞株におけるIL-6Rの発現

悪性中皮腫5株のIL-6受容体発現量をmRNA レベルで測定した。

陽性対照としてKT-3 細胞を用い、陰性対照として潤膜細胞(Synovi

ocytes)を使用した。これらの細胞を10%FCS添加RPMI中で48時間培養し、細胞中のIL-6受容体(IL-6R)をコードするmRNAを、検出手段としてGeneAmp PCR System(Applied Biosystems社)を用いるreverse-transcribed-PCR(RTPCR)法により測定した。結果を図2に示す。なお、図2(下)は、内在性コントロールとして使用したGAPDH(グリセラルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)のmRNA量を示す。

この結果より、悪性中皮腫細胞はIL-6受容体を殆ど発現していないと考えられる。悪性胸膜中皮腫症例の胸水は血性胸水であるため、可溶性IL-6受容体が多量に存在し、これがIL-6刺激伝達に関与していると推測される。

#### 実施例3. IL-6刺激によるVEGF産生誘導(1)

悪性中皮腫細胞株H2052およびH2452の腫瘍細胞を、RPMI 1640培地中で、初期細胞濃度 $5 \times 10^4$ ／ウエルとして、24－ウエルプレート上3連で培養した。翌日、細胞培養液を交換し、(1)組換えIL-6(10 ng/ml)、(2)組換えIL-6(10 ng/ml) +組換え可溶性IL-6R(100 ng/ml)による刺激、及び(3)抗IL-6受容体抗体であるヒト型化PM-1抗体(WO 92/19759参照)(25  $\mu$ g/ml)による阻害を開始した(RPMIは培地対照)。更に3日間培養した後、培養上清中の血管形成誘導因子(VEGF)の濃度を、Quantikine Human VEGF Immunoassay Kit(R & D Systems社)により測定し、細胞蛋白質量で補正した。

結果を図3に示す。この図から明らかな通り、H2052細胞株およびH2452細胞株ではIL-6刺激によりVEGF産生が誘導された。

#### 実施例4. IL-6刺激によるVEGF産生誘導(2)

悪性中皮腫細胞株H28を用いて、実施例3の実験を反復した。結果を図4に示す。この結果から明らかな通り、H28細胞株はVEGF高産生株であるが、IL-6刺激に対しては無反応であった。

### 実施例 5. IL-6刺激によるSTAT3のリン酸化

IL-6によるVEGF産生誘導株であるH2025細胞株およびIL-6によるVEGF産生非誘導株であるH28細胞株を、組換えIL-6(10 ng/ml)及び可溶性組換えIL-6受容体(100ng/ml)の存在下で、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)と共にインキュベートし、インキュベーションの0時間目、0.5時間目及び1時間目に、STAT3からp-STAT3へのリン酸化についてウエスタンプロットにより分析した。結果を図5に示す。

図5から明らかな通り、H2052細胞株では、IL-6刺激後30分でSTAT3の著明なリン酸化が認められた。対照的にH28細胞株ではIL-6刺激に対しては僅かなSTAT3のリン酸化しか認められなかった。なお、図5中、p-STAT3はリン酸化STAT3を示し、STAT3はリン酸化と非リン酸化STAT3の総和を示す。

### 実施例 6. IL-6刺激によるSOCS3の誘導

IL-6によるVEGF産生誘導株であるH2025細胞株およびIL-6によるVEGF産生非誘導株であるH28細胞株を、組換えIL-6(10 ng/ml)及び可溶性組換えIL-6受容体(100ng/ml)の存在下でインキュベートして刺激を行い、インキュベーションの0時間目、2時間目及び4時間目に、誘導されたsuppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)及びグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現量を、それらをコードするmRNAのRT-PCRによる増幅後の測定により、測定した。結果を、図6に示す。

図6から明らかな通り、H2052細胞株では、IL-6刺激後2時間でSOCS3 mRNAの誘導が認められた。H28細胞株では恒常的なSOCS3の高発現が観察された。

### 実施例 7. VEGFプロモーターアッセイ

VEGFプロモーターによりルシフェラーゼ遺伝子の発現をコントロ

ールするプラスミドpGL3-VEGF、及びリン酸化STAT3結合部を崩した変異型VEGFプロモーターによりルシフェラーゼ遺伝子の発現をコントロールするプラスミドpGL3-VEGF<sub>mut</sub>を作成した(図7)。

H2052細胞50,000当り1 $\mu$ gのpGL3-VEGFまたはpGL3-VEGF<sub>mut</sub>をトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を組換えIL-6(10ng/ml)および組換え可溶性IL-6受容体(100ng/ml)で刺激した。2日間刺激のあと、VEGFプロモーターおよび変異型VEGFプロモーターから誘導されたルシフェラーゼ活性を検討した。結果を図8に示す。

図8から明らかな通り、VEGFプロモーターからリン酸化STAT3結合部を削除した場合、IL-6刺激によるVEGFプロモーターの活性化は見られなくなった。上記実施例5、6及び7の結果から、H2052細胞株におけるIL-6刺激によるVEGF産生増強は、JAK-STAT系を介しているものと考えられた。この予想される系を図9に示す。

実施例8. IL-6及び可溶性IL-6受容体添加によるH2052、H226の増殖促進

H2052細胞株を、10%FCS添加RPMI培地中、96-ウエルプレートに500細胞/ウェルで細胞を播き、組換え可溶性IL-6受容体の100ng/mlでの存在下または非存在下で、且つ種々の濃度(0、1、10又は100ng/ml)のIL-6の存在下で、5連で、6~7日間培養した。結果を図10及び図13に示す。これらの図から明らかな通り、H2052細胞株及びH226細胞株は組換え可溶性IL-6受容体(100ng/ml)存在下で、IL-6濃度依存的に増殖する。

実施例9. IL-6及びIL-6Rの添加によるH2052細胞の増殖促進のIL-6Rに対する抗体(抗IL-6R抗体)による抑制

IL-6及びIL-6受容体によるH2052細胞株の増殖促進が抗IL-6R抗体により抑制されるか否かを見るため、H2052細胞株を、10%FCS添加R

PMI培地中、96-ウエルプレートに500細胞／ウェルで細胞を播き、10ng/mlの組換え可溶性IL-6及び100ng/mlの組換え可溶性IL-6受容体の存在下で、且つ種々の濃度（0、1μg/ml又は25μg/ml）のヒト型化PM-1抗体の存在下で、3連で、7日間培養した。培養後、MTSアッセイによりH2052細胞株の増殖量（OD 450）を測定した。結果を図11に示す。その結果、抗IL-6R抗体は濃度依存性に増殖を抑制することがわかった。一方、対照として、MRAの代わりに同じ濃度のヒトIgG1を加えた場合、抑制効果は見られなかった。

実施例10. IL-6及び可溶性IL-6受容体添加によるによるH226の増殖促進、及び抗IL-6R抗体による抑制

H226細胞株を、10%FCS添加 RPMI培地 中、96-ウエルプレートに、500細胞／ウェルの濃度で細胞濃度で播き、組換え可溶性IL-6受容体の100ng/mlでの存在下で、且つ種々の濃度（0、1、10又は100ng/ml）のIL-6の存在下で、又は25μg/mlのMRAの存在下で、3連で、7日間培養した。結果を図12に示す。この図から明らかな通り、IL-6高生産性のH226細胞株は、IL-6高生産性のH2052細胞株と同様、組換え可溶性IL-6受容体(100ng/ml)存在下で、IL-6濃度依存的に増殖し、その増殖は抗IL-6R抗体により抑制された。

実施例11. IL-6及び可溶性IL-6受容体添加によるH2052細胞株、H226細胞株の増殖促進の抗IL-6受容体抗体による抑制

H2052細胞株及びH226細胞株を、10%FCS添加 RPMI培地 中、96-ウエルプレートに200細胞／ウェルで細胞を播き、IL-6 (10ng/ml) 及び可溶性IL-6受容体 (100ng/ml) の存在下で、且つ種々の濃度（0、1μg/ml、5μg/ml）のヒト型化PM-1抗体の存在下で、5連で、6日間培養した。培養後、MTSアッセイによりH2052細胞株及びH226細胞株の細胞増殖率を測定した。細胞増殖率は、IL-6/sIL-6R無添加に比べて何倍増殖したかによって示す。結果を図14に示す。その

結果、抗IL-6受容体抗体は、H2052細胞株及びH226細胞株のIL-6/sIL-6R添加による増殖促進作用を完全に抑制した。一方、対照として、抗IL-6受容体抗体の代わりに同じ濃度のヒトIgG1 (Sigma) を添加した場合、増殖抑制効果は認められなかった。

実施例12. 抗IL-6受容体抗体による、IL-6刺激によるVEGF産生誘導の抑制

ヒト型化PM-1抗体の濃度 (0.1  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml) 以外は実施例3と同じ条件で、抗IL-6受容体抗体による、悪性中皮腫細胞株MST0、H226、H2052及びH2452におけるIL-6刺激によるVEGF産生誘導の抑制作用を検討した。結果を図15に示す。その結果、抗IL-6受容体抗体は、IL-6/sIL-6R刺激によるVEGF産生誘導を完全に抑制した。一方、対照として、抗IL-6受容体抗体の代わりに同じ濃度のヒトIgG1 (Sigma) を添加した場合、VEGF産生誘導の抑制作用は認められなかった。

実施例13. 抗IL-6受容体抗体によるSTAT3リン酸化の抑制

VEGF産生誘導株であるH2052細胞株及びH2452細胞株で、IL-6 (10 ng/ml) 及び可溶性IL-6受容体 (100ng/ml) 刺激により誘導されるSTAT3リン酸化が、5  $\mu$ g/mlの抗IL-6受容体抗体により抑制されるかを検討した。結果を図16に示す。その結果、抗IL-6受容体抗体は、悪性中皮腫細胞においてIL-6/sIL-6R刺激により誘導されるリン酸化STAT3 (p-STAT3) を顕著に抑制した。一方、対照として、抗IL-6受容体抗体の代わりに同じ濃度のヒトIgG1 (Sigma) を添加した場合、STAT3のリン酸化の抑制はほとんど認められなかった。

実施例14. 悪性中皮腫細胞の増殖に対する抗VEGF抗体の効果

H2052細胞株及びH226細胞株を、10%FCS添加RPMI培地中、96-ウェルプレートに500細胞/ウェルで細胞を播き、IL-6 (10ng/ml) 及び組換え可溶性IL-6受容体 (100ng/ml) の存在下で、且つ1  $\mu$ g/ml

の抗VEGF抗体の存在下で、5連で、6～7日間培養した。培養後、MTSアッセイにより増殖量を検討した。対照としては、抗VEGF抗体の代わりに同じ濃度のヒトIgG1 (Sigma) を用いた。結果を図17に示す。その結果、抗VEGF抗体は、IL-6/sIL-6R刺激による細胞増殖を抑制しなかった。このことから、IL-6/sIL-6R刺激による悪性中皮腫細胞増殖作用は、VEGFを介するものでないことが判明した。

参考例 1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR 法により可溶性IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph Iで消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18 (Amersham製) に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミニュータジエネシスシステム (Amersham製) により、PCR 法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345 の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO 細胞で発現するために、プラスミドpSV (Pharmacia製) と連結させ、プラスミドpSVL344を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO 細胞発現プラスミドpECEdhfr344を得た。

10  $\mu$  g のプラスミドpECEdhfr344 をdhfr-CHO細胞株DXB-11 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) ヘカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO 細胞を1mM グルタミン、10% 透析FC

S、100U/ml のペニシリンおよび  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシンを含むヌグレオシド不含 αMEM 選択培養液で3週間培養した。

選択されたCHO 細胞を限界希釀法でスクリーニングし、単一のCHO 細胞クローンを得た。このCHO 細胞クローンを20nM～200nM の濃度のメトトレキセートで増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO 細胞株5E27を得た。CHO 細胞株5E27を5%FBS を含むイスコープ改変ダルペコ培養液 (IMDM、Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISA にて測定した。その結果、培養上清中には可溶性IL-6受容体が存在することが確認された。

#### 参考例2. 抗ヒトIL-6抗体の調製

$10\mu\text{g}$  の組換型IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウスを免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局部のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT 培養液を用いるOিらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H.Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、抗ヒトIL-6抗体を產生するハイブリドーマを樹立した。

抗ヒトIL-6抗体を產生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の96穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で  $100\mu\text{l}$  のヤギ抗マウスIg ( $10\mu\text{l}/\text{ml}$ , Cooper Biomedical, Inc 製 Malvern, PA) により4°Cで一晩コートした。次いで、プレートを  $100\mu\text{l}$  の1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS に

より室温で2時間処理した。

これをPBSで洗浄した後、 $100\mu\text{l}$ のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、 $4^\circ\text{C}$ にて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、 $2000\text{cpm}/0.5\text{ng}/\text{well}$ となるように $^{125}\text{I}$ 標識組換型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター( Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA)で測定した。216ハイブリドーマクローンのうち32のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗IL-6抗体MH166はIgG1 $\kappa$ のサブタイプを有する。

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH60.BSF2を用いてMH166抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH60.BSF2細胞を $1 \times 10^4 / 200\mu\text{l}/\text{穴}$ となるように分注し、これにMH166抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、 $0.5\mu\text{Ci}/\text{穴}$ の $^3\text{H}$ チミジン(New England Nuclear, Boston, MA)を加えた後、更に6時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター(Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan)で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166抗体はIL-6により誘導されるMH60.BSF2細胞の $^3\text{H}$ チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

### 参考例3. 抗ヒトIL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法(Hirata, Y. et al. J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)により作成した抗IL-6受容体抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B(Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ)と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6受容体(Yama

saki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製) , 10 mMトリエタノールアミン (pH 7.8) および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオライドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

BALB/cマウスを $3 \times 10^9$  個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。5  $\mu$ 10<sup>7</sup> 個のU266細胞を<sup>35</sup>S-メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により<sup>35</sup>S-メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025ml の1M Tris (pH 7.4) で中和した。

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース (Phramacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005ml の<sup>35</sup>S 標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1 (FERM BP-2998)を樹立した。ハイブリドーマPM-1から產生される抗体は、IgG1 $\kappa$ のサブタイプを有する。

ハイブリドーマPM-1が產生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。

ヒト組換型IL-6を大腸菌より調製し (Hirano, T. et al., *Immunol Lett.* (1988) 17, 41-45) 、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により  $^{125}$ I 標識した (Taga, T. et al., *J. Exp. Med.* (1987) 166, 967-981) 。

$4 \times 10^5$  個のU266細胞を1 時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清および14000cpmの  $^{125}$ I 標識IL-6とともに培養した。70  $\mu$  l のサンプルを 400  $\mu$  l のマイクロフェージポリエチレンチューブに 300  $\mu$  l のFCS 上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が產生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

#### 参考例4. 抗マウスIL-6受容体抗体の調製

Saito, T. et al., *J. Immunol.* (1991) 147, 168-173 に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を產生するCHO 細胞を10%FCSを含むIMDM 培養液で培養し、その培養上清から抗マウスIL-6受容体抗体RS12 (上記Saito, T. et al 参照) をAffigel 10ゲル (Biorad製) に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

得られたマウス可溶性IL-6受容体50  $\mu$  g をフロイント完全アジュバンドと混合し、ウイスターラットの腹部に注射した。2 週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラット脾臓細胞を採取し、 $2 \times 10^8$  個を $1 \times 10^7$  個のマウスミエローマ細胞P3U1と50% のPEG1500 (Boehringer Mannheim 製) をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT 培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

ウサギ抗ラット IgG 抗体 (Cappel製) をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフェオスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgG によるELISA 法によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を產生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の產生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

このハイブリドーマが產生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2 細胞 (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956) を用いた<sup>3</sup>H チミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2 細胞を1 ラ $10^4$  個/200  $\mu$  l / ウェルとなるように調製した。このプレートに10pg/ml のマウスIL-6とMR16-1抗体又はRS12抗体を12.3~1000ng/ml 加えて37°C、5%CO<sub>2</sub> で44時間培養した後、1  $\mu$  Ci/ ウェルの<sup>3</sup>H チミジンを加えた。4 時間後に<sup>3</sup>H チミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60.BSF2 細胞の<sup>3</sup>H チミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1 (FERM BP-5875)が產生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

## 請 求 の 範 囲

1. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含んで成る中皮腫治療剤。
2. 前記中皮腫が胸膜中皮腫である、請求項1に記載の中皮腫治療剤。
3. 前記胸膜中皮腫が悪性胸膜中皮腫である、請求項2に記載の中皮腫治療剤。
4. 前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の中皮腫治療剤。
5. 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項4に記載の中皮腫治療剤。
6. 前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項4に記載の中皮腫治療剤。
7. 前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項4に記載の中皮腫治療剤。
8. 前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項4～7のいずれか1項に記載の中皮腫治療剤。
9. 前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項6に記載の中皮腫療剤。
10. 前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項7に記載の中皮腫治療剤。
11. 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項4～10のいずれか1項に記載の中皮腫治療剤。
12. 前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、請求項11に記載の中皮腫治療剤。

13. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含んで成る中皮腫細胞に対する増殖抑制剤。
14. 前記中皮腫が胸膜中皮腫である、請求項13に記載の増殖抑制剤。
15. 前記胸膜中皮腫が悪性胸膜中皮腫である、請求項14に記載の増殖抑制剤。
16. 前記IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体である、請求項13～15のいずれか1項に記載の増殖抑制剤。
17. 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項16に記載の増殖抑制剤。
18. 前記IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項16に記載の増殖抑制剤。
19. 前記IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体である、請求項16に記載の増殖抑制剤。
20. 前記IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体である、請求項16～19のいずれか1項に記載の増殖抑制剤。
21. 前記ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項18に記載の増殖抑制剤。
22. 前記マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項19に記載の増殖抑制剤。
23. 前記IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項16～22のいずれか1項に記載の増殖抑制剤。
24. 前記IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体である、請求項23に記載の増殖抑制剤。

Fig. 1

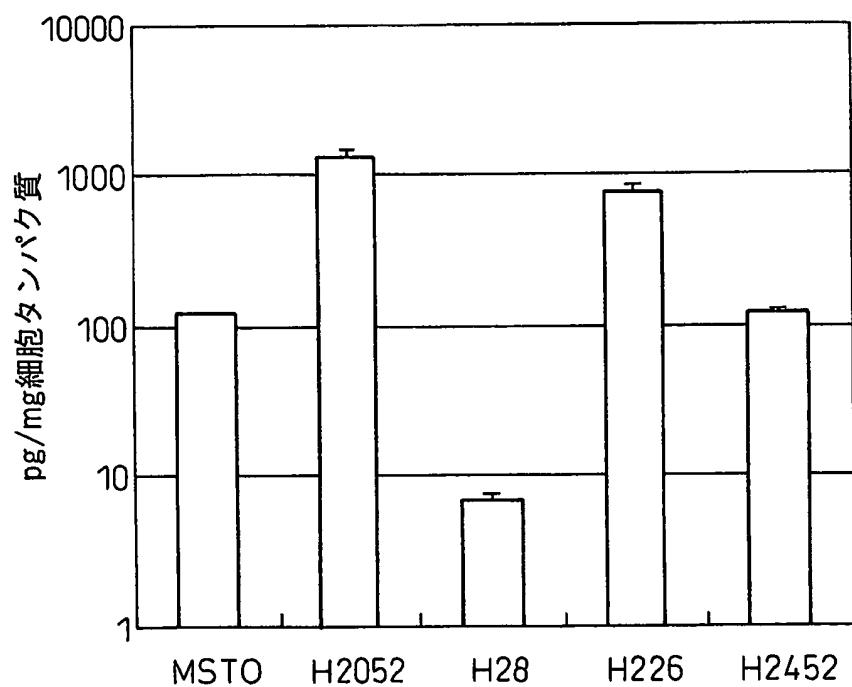


Fig.2

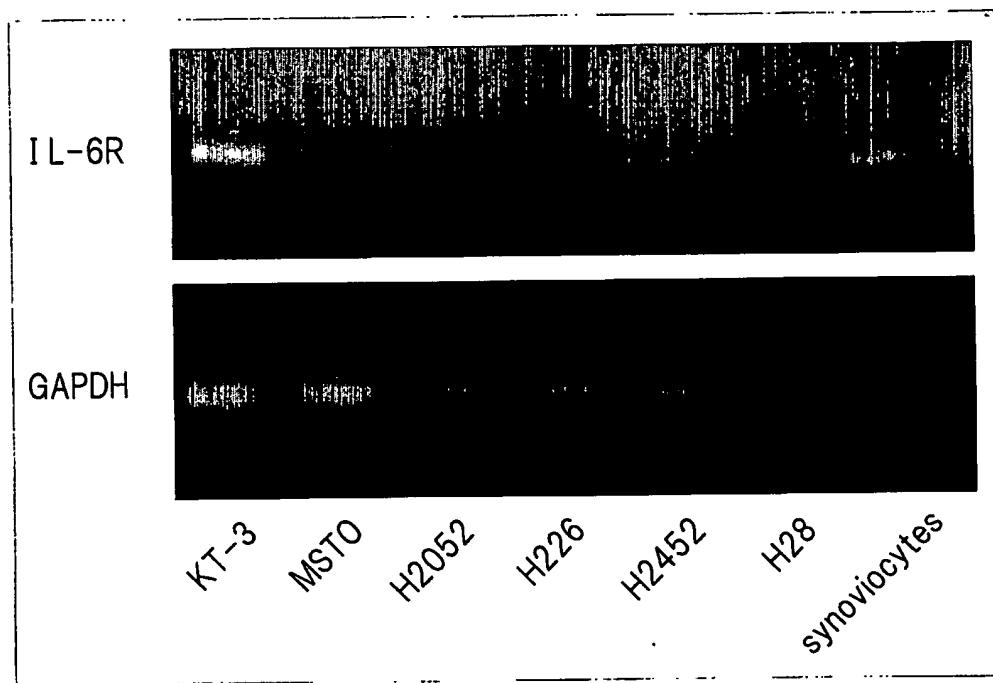
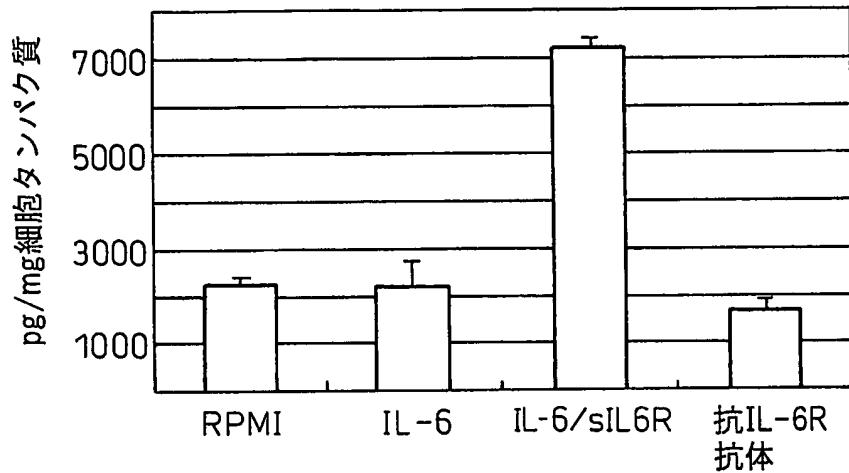


Fig.3

(A)



(B)

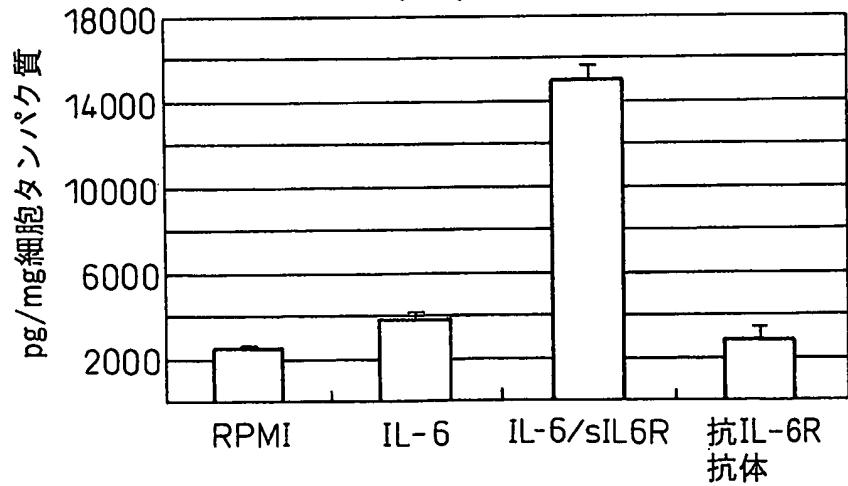


Fig.4

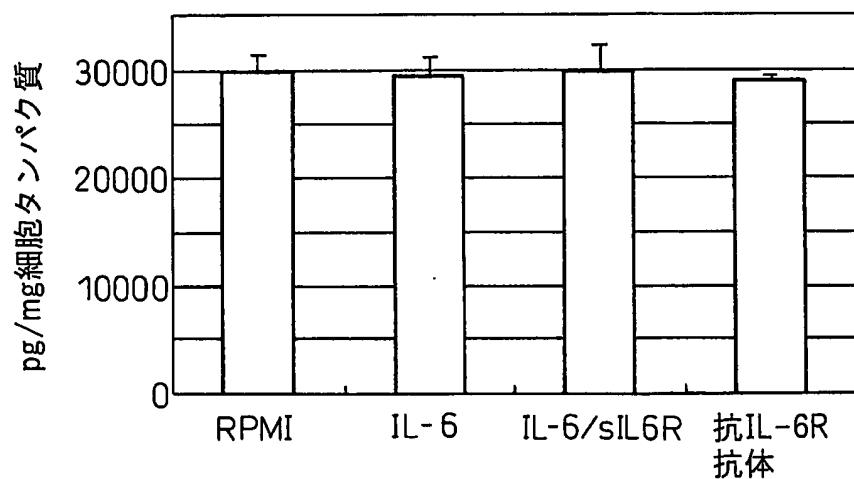


Fig.5

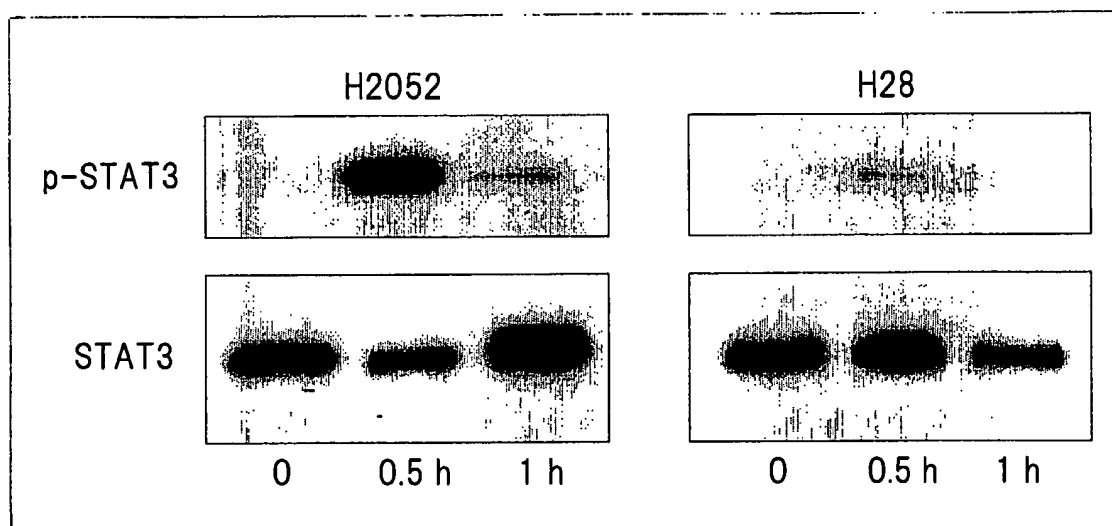


Fig.6

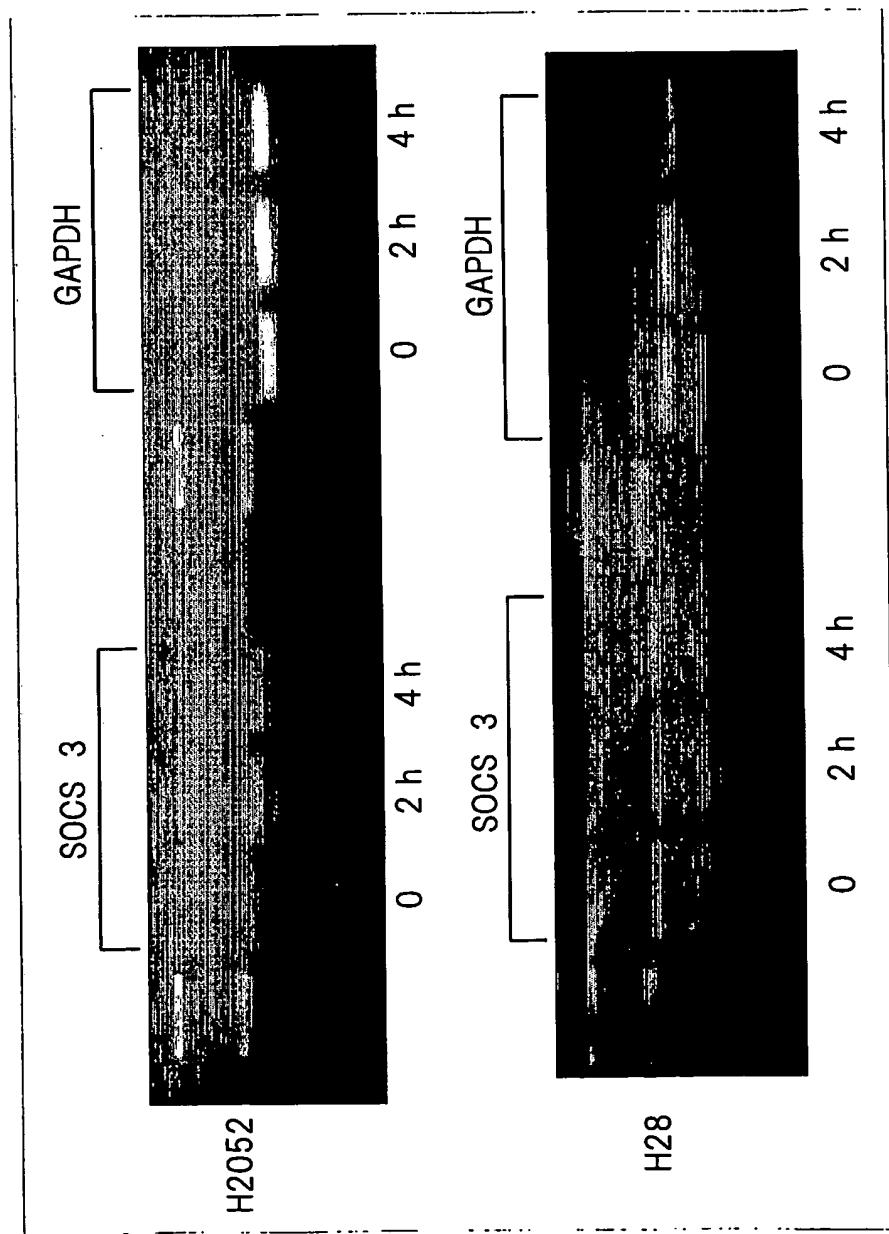


Fig.7

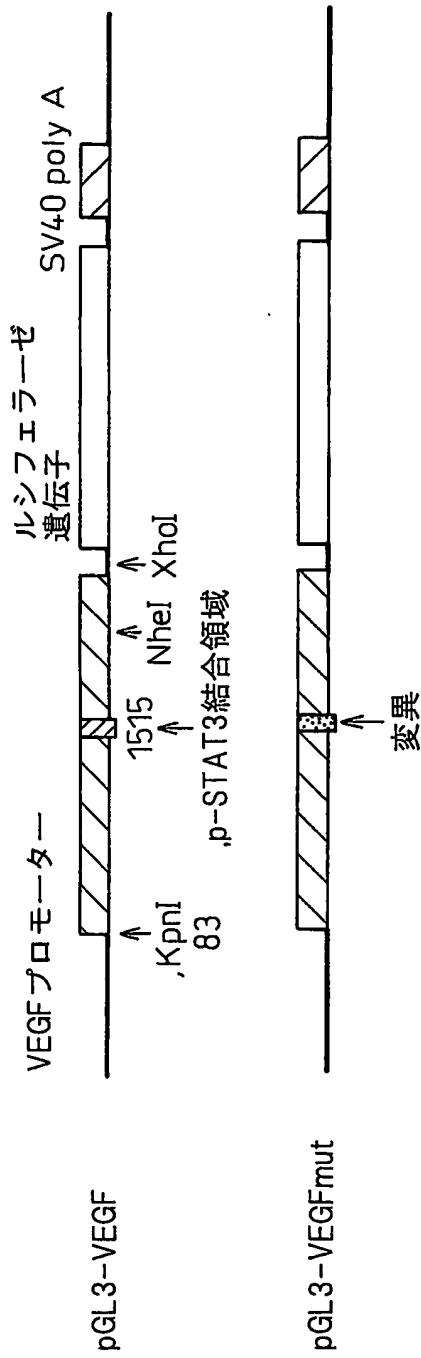


Fig.8

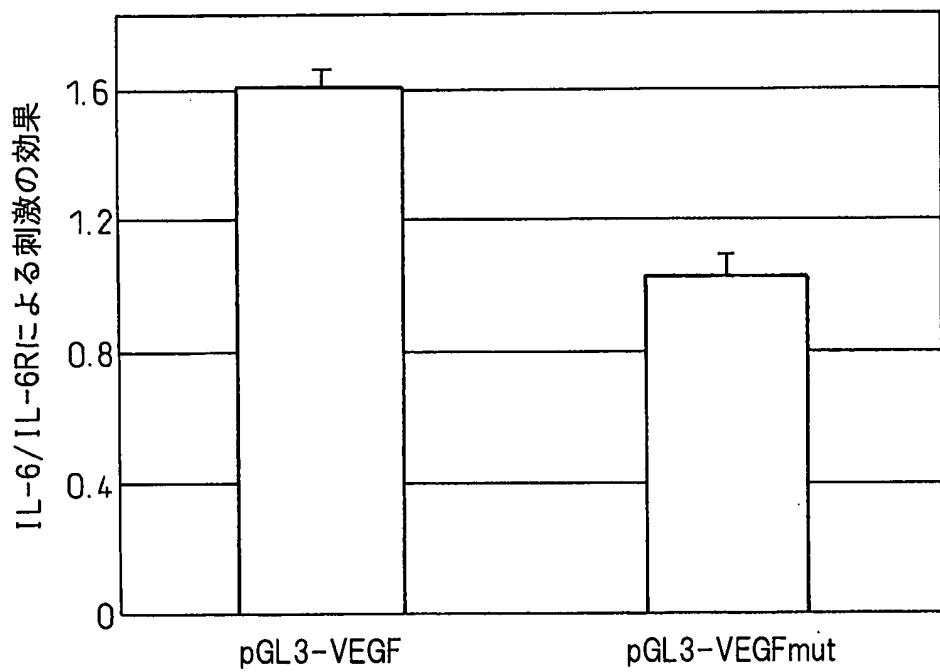


Fig.9

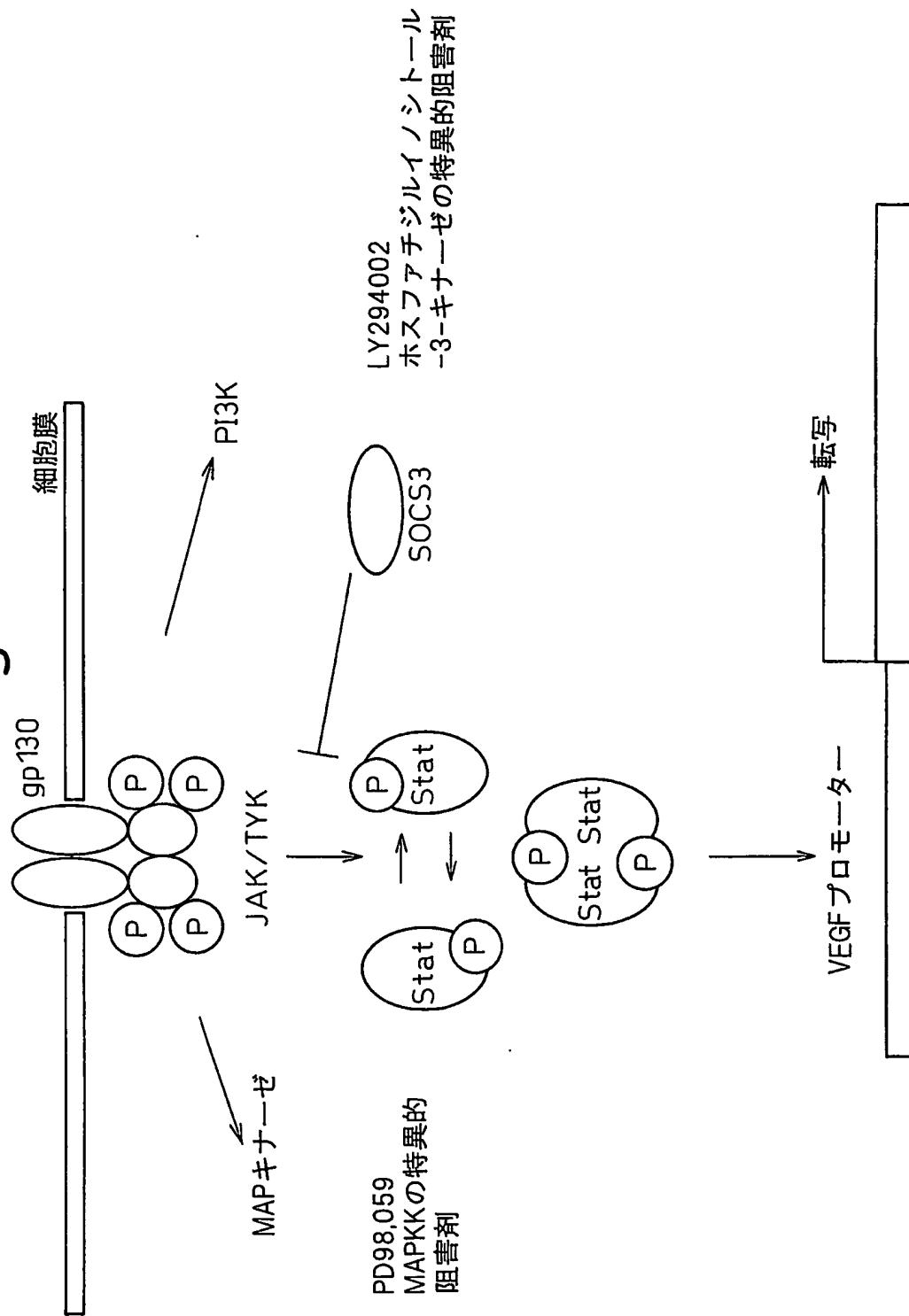


Fig.10

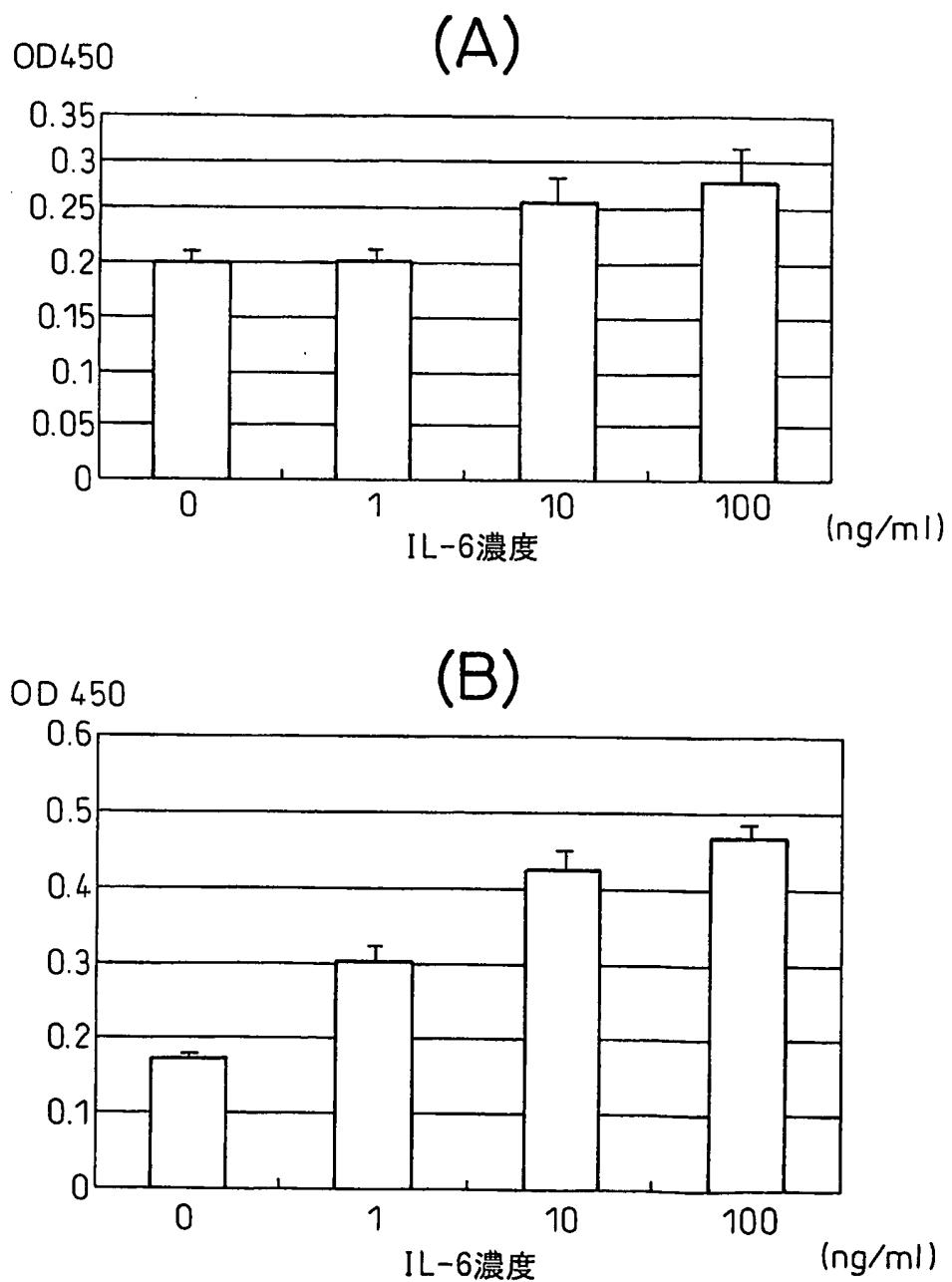


Fig. 11

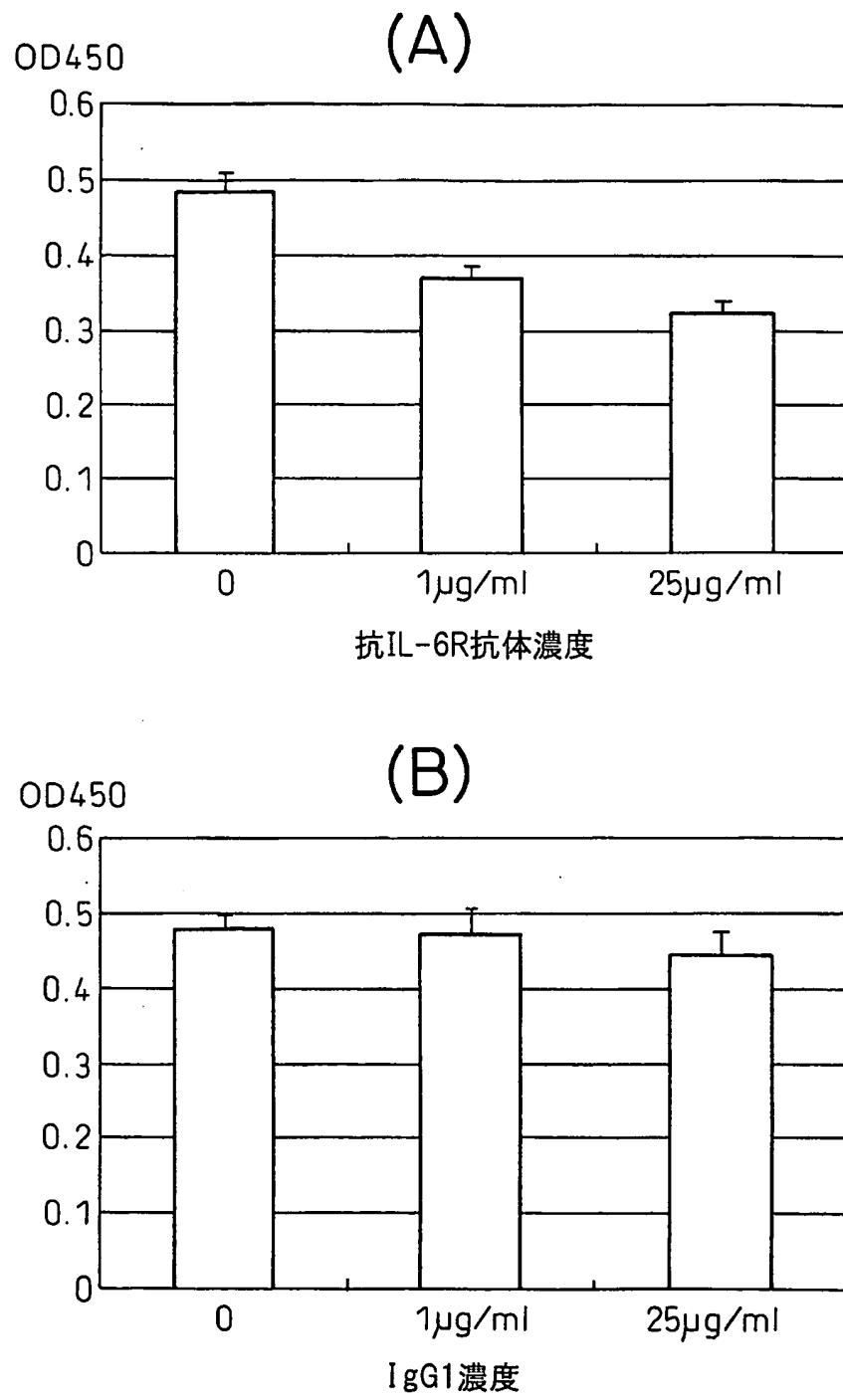


Fig. 12

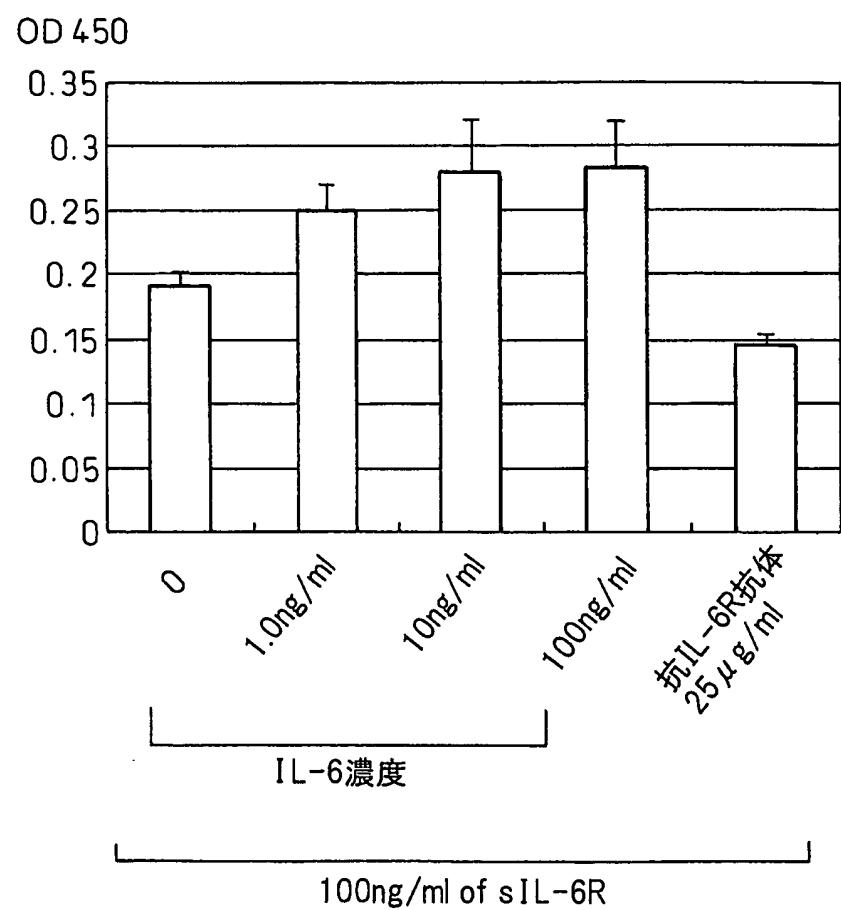


Fig. 13

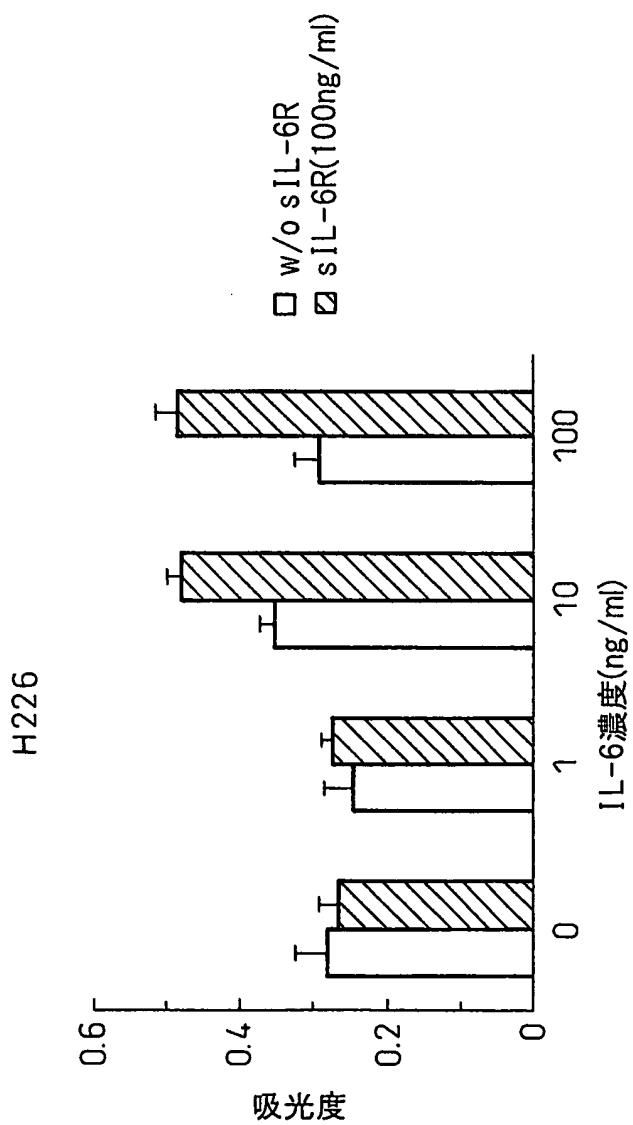
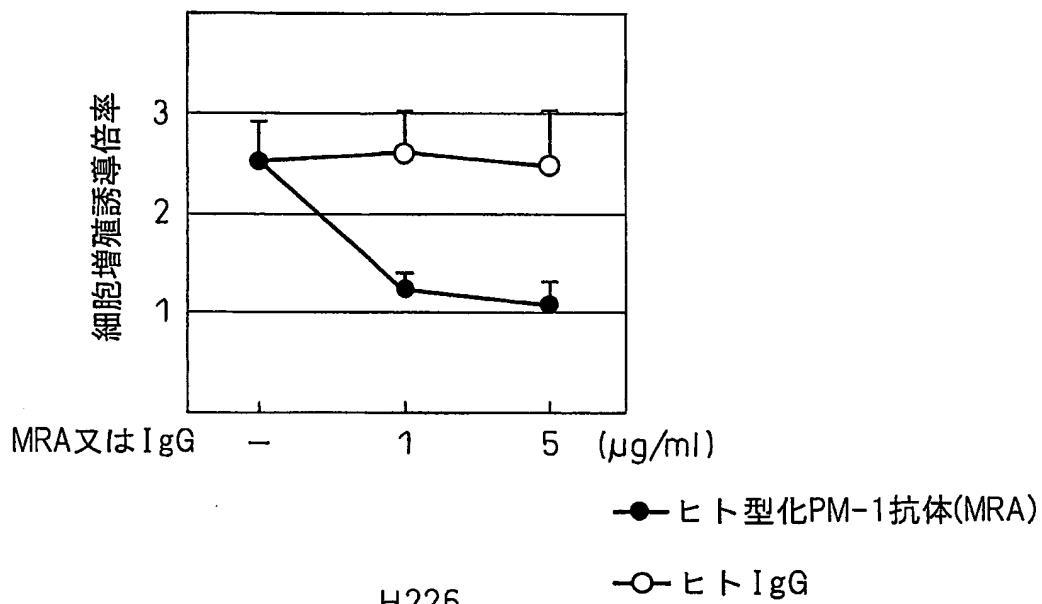


Fig.14

H2052



H226

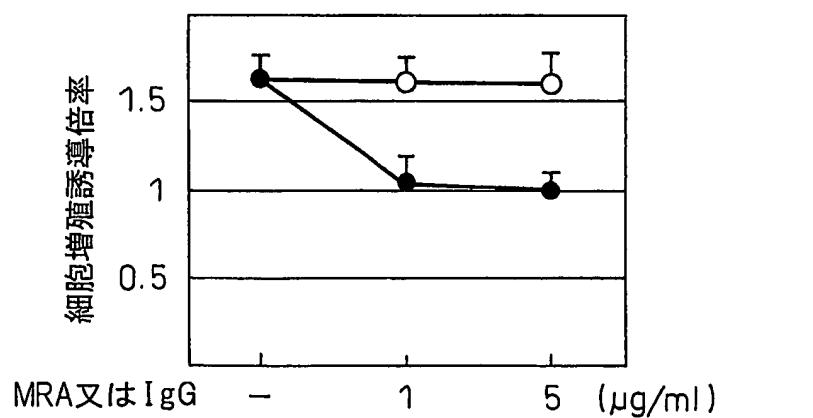


Fig.15

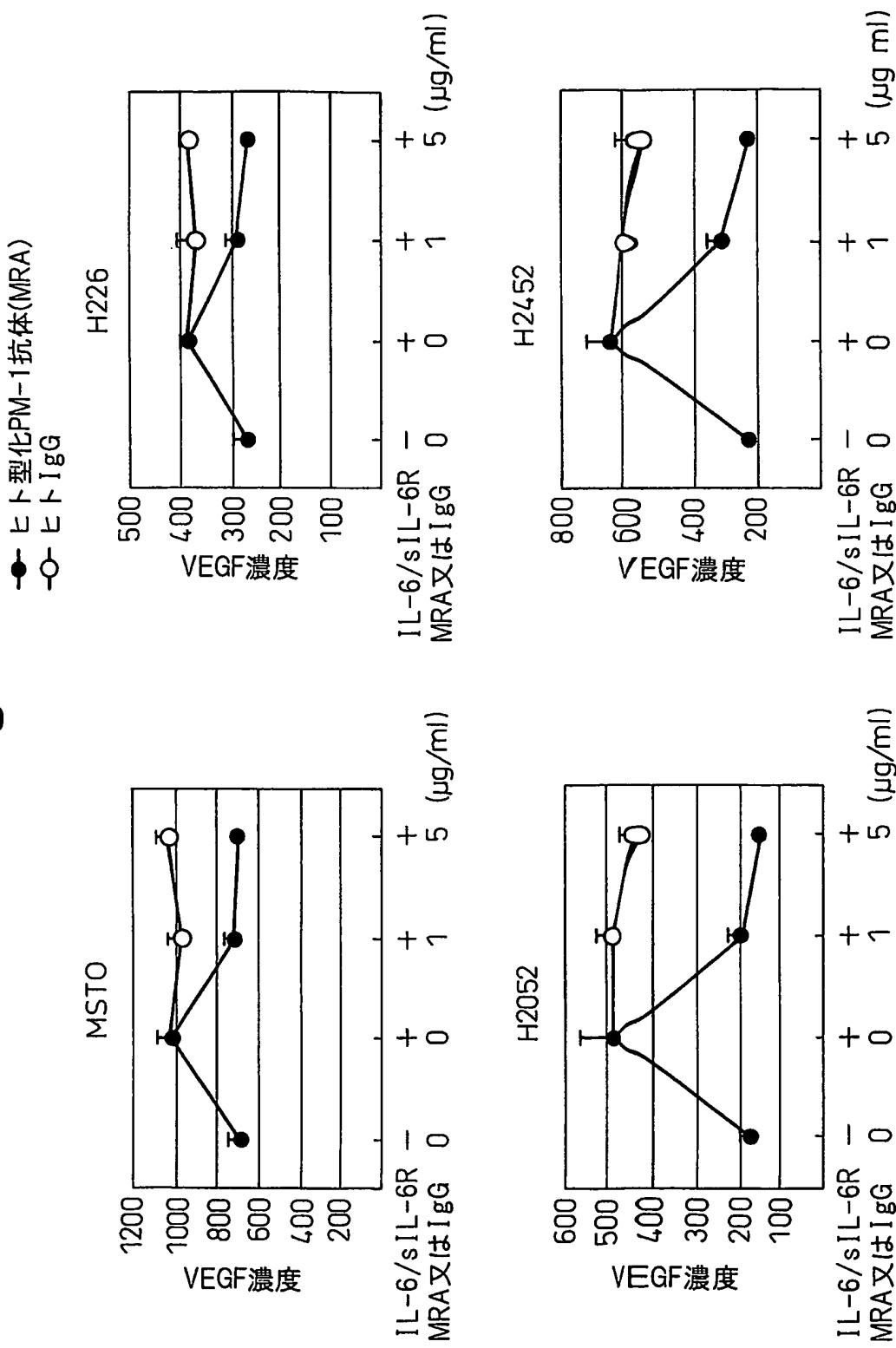


Fig.16

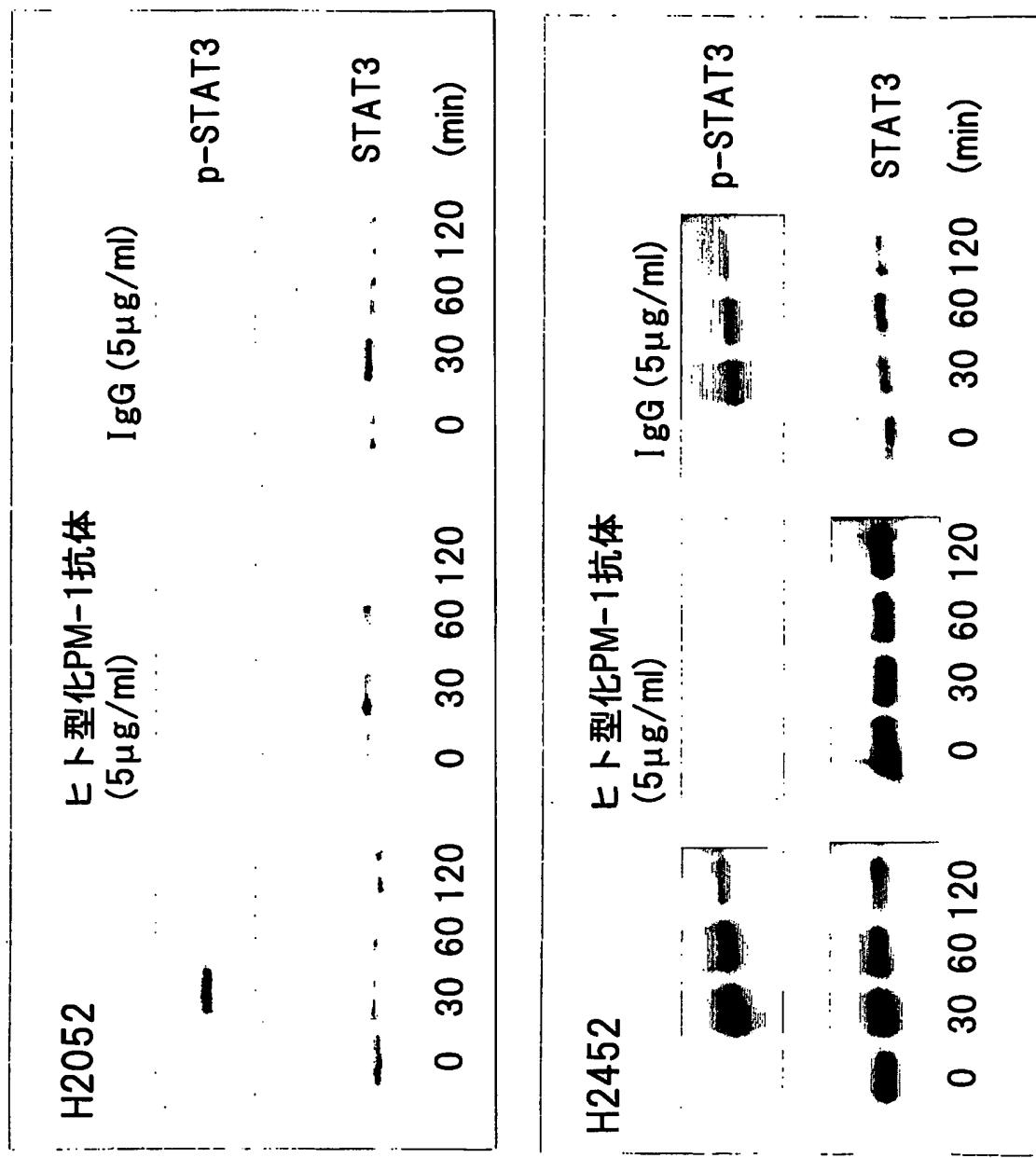
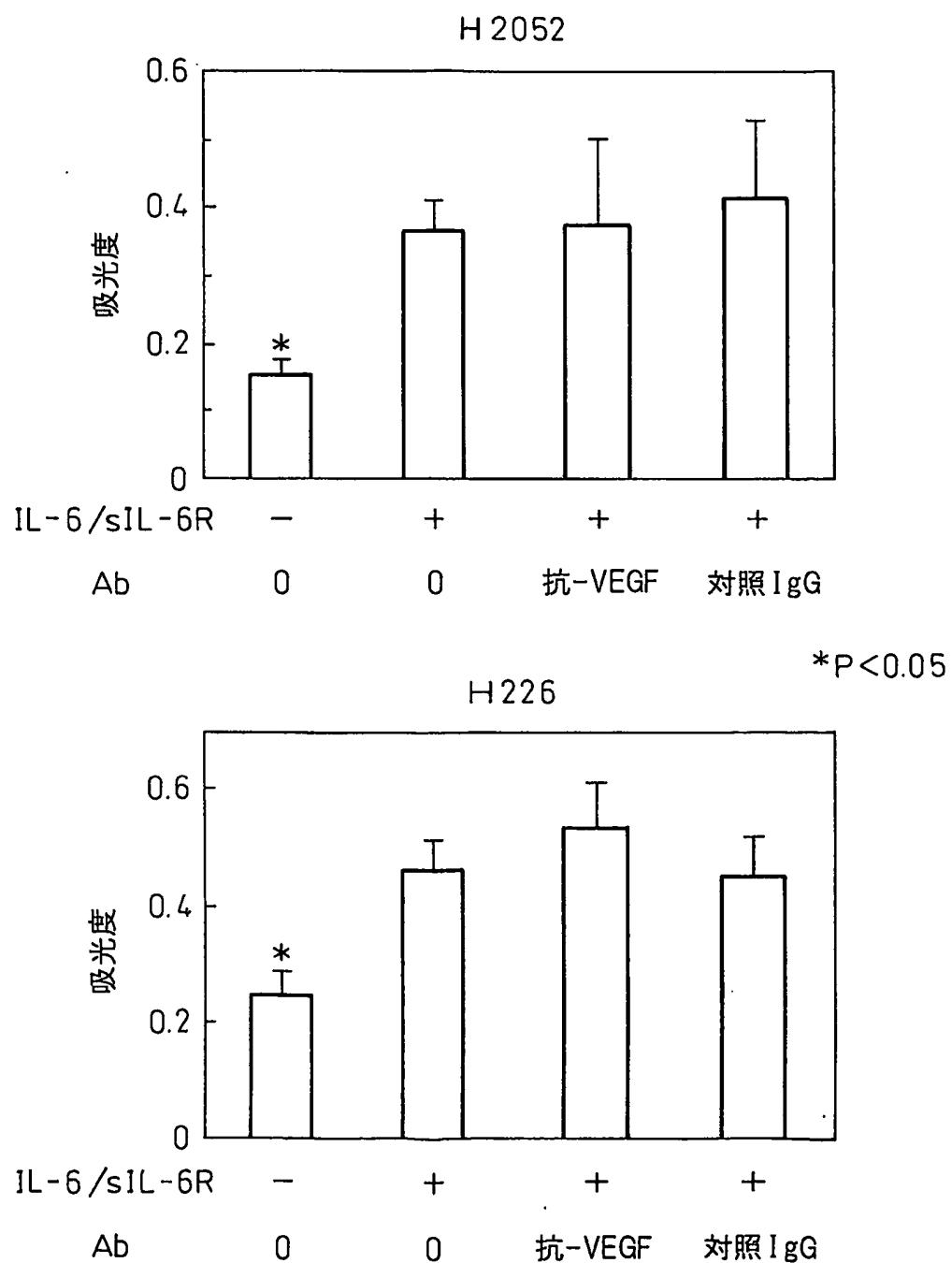


Fig.17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015674

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H.Bielefeldt-Ohmann et al., Interleukin-6 involvement in mesothelioma pathobiology: inhibition by interferon $\alpha$ immunotherapy, Cancer Immunol. Immunother., 1995, Vol.40, pages 241 to 250	1-24
A	Hiroshi SUZUKI et al., Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo, Eur.J.Immunol., 1992, Vol.22, pages 1989 to 1993	1-24
X	JP 8-245414 A (PRIVATE BIOLOGICALS CORP.), 24 September, 1996 (24.09.96), Full text & WO 96/40966 A & AU 9660381 A	1-3,13-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 November, 2004 (19.11.04)Date of mailing of the international search report  
07 December, 2004 (07.12.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2004/015674
--

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/42484 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 14 June, 2001 (14.06.01), Full text & AU 2001/20663 A & US 2002/0037523 A1 & EP 1244807 A1 & JP 2004-500810 A	1-3,13-15
A	T. NAKANO et al., Interleukin 6 and its relationship to clinical parameters in patients with malignant pleural mesothelioma, British Journal of Cancer, 1998, Vol.77, No.6, pages 907 to 912	1-24
A	Masaaki HIGASHIHARA, M.D., Increased Secretion of Interleukin-6 in Malignant Mesothelioma Cells from a Patient with Marked Thrombocytosis, Cancer, Vol.70, No.8, 1992, pages 2105 to 2108	1-24

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K 45/00, 39/395, A61P 35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K 45/00, 39/395, A61P 35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	H. Bielefeldt-Ohmann et al., Interleukin-6 involvement in mesothelioma pathobiology: inhibition by interferon $\alpha$ immunotherapy, Cancer Immunol. Immunother., 1995, Vol. 40, p. 241-250	1-24
A	Hiroshi Suzuki et al., Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo, Eur. J. Immunol., 1992, Vol. 22, p. 1989-1993	1-24

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 11. 2004

国際調査報告の発送日

07.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4C 9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP 8-245414 A (プライベイト バイオロジカルズ コーポレイション) 1996. 09. 24, 全文 &WO 96/40966 A &AU 9660381 A	1-3, 13-15
X	WO 01/42484 A1 (ヒューマン ジノーム サイエン シーズ、インコーポレイテッド) 2001. 06. 14, 全文 &AU 2001/20663 A &US 2002/0037523 A1 &EP 1244807 A1 &JP 2004-500810 A	1-3, 13-15
A	T Nakano et al., Interleukin 6 and its relationship to clinical parameters in patients with malignant pleural mesothelioma, British Journal of Cancer, 1998, Vol. 77, No. 6, p. 907-912	1-24
A	Masaaki Higashihara, M.D., Increased Secretion of Interleukin-6 in Malignant Mesothelioma Cells from a Patient with Marked Thrombocytosis, Cancer, Vol. 70, No. 8, 1992, p. 2105-2108	1-24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**